



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

MARÍLIA MATOS REZENDE

**COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E
ACETATO DE HECOGENINA PRODUZ EFEITO ANALGÉSICO
SUPERIOR EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL**

**SÃO CRISTÓVÃO – SE
2018**

MARÍLIA MATOS REZENDE

**COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE β -CICLODEXTRINA E
ACETATO DE HECOGENINA PRODUZ EFEITO ANALGÉSICO
SUPERIOR EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia, da
Universidade Federal de Sergipe
como requisito à obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Jullyana de
Souza Siqueira Quintans

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2018

RESUMO

Introdução: O tratamento da dor principalmente da dor orofacial e suas intervenções terapêuticas a fim de melhorar a qualidade de vida e sanar os sintomas dolorosos do paciente têm sido o principal problema atual da medicina, não só pela limitação das opções que existem, mas também pela quantidade de efeitos colaterais que os acompanham. Por isso o estudo de substâncias derivadas de produtos naturais são uma esperança para a melhoria do manejo da dor. As espécies de plantas do gênero *Agave* ou “sisal” utilizadas na medicina popular do nordeste brasileiro por possuírem propriedades terapêuticas favoráveis, já vem sendo utilizadas pela indústria como base para síntese de hormônios esteroidais. Estudos anteriores observaram que a hecogenina, uma saponina esteroideal presente nesse gênero de plantas, na forma acetilada, demonstrou efeito anti-nociceptivo e anti-inflamatório em modelos animais. A fim de contornar a baixa solubilidade aquosa do AH, pensou-se em aproveitar a capacidade que as moléculas de ciclodextrina (CD) possuem em formar complexos de inclusão com substâncias de caráter apolar, a fim de melhorar a hidrossolubilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade. **Objetivo:** Avaliar a atividade anti-nociceptiva do acetato de hecogenina (AH) e do AH/ β -ciclodextrina (AH- β CD) em modelo de dor orofacial em roedores. **Métodos:** Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-30 g) (CEPA/UFS#04/12) submetidos a modelos de dor orofacial induzida por formalina, capsaicina e glutamato. Os animais (n=6) foram tratados com o AH ou AH- β CD (20 mg/kg), ou veículo, por via oral. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. **Resultados:** Foi observado que o complexo AH- β CD apresentou melhoria no efeito anti-nociceptivo no modelo de dor induzido por formalina e glutamato em comparação com o controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$). **Conclusão:** Com os resultados obtidos, portanto, observamos que o AH quando complexado com a β -CD demonstrou efeito anti-nociceptivo melhor do que o puro em modelos animais de dor orofacial utilizados.

Palavras-chave: dor orofacial, ciclodextrina, acetato de hecogenina.

ABSTRACT

Introduction: The treatment of pain mainly of orofacial pain and its therapeutic interventions in order to improve the quality of life and remedy the painful symptoms of the patient have been the main current problem of medicine, not only by limiting the options that There are, but also by the amount of side effects that accompany them. Therefore, the study of substances derived from natural products is a hope for the improvement of pain management. The species of plants of the genus *Agave* or "sisal" used in the popular medicine of the Brazilian Northeast for possessing favorable therapeutic properties, have already been used by the industry as a basis for synthesis of steroidal hormones. Previous studies have observed that hecogenin, a steroidal saponin present in this genus of plants, in the acetylated form, demonstrated anti-nociceptive and anti-inflammatory effect in animal models. In order to overcome the low aqueous solubility of HA, it has been envisaged to take advantage of the ability of cyclodextrin (CD) molecules to form inclusion complexes with non-polar substances in order to improve water solubility and hence bioavailability. **Objective:** To evaluate the anti-nociceptive activity of the Hecogenina acetate (HA) and the AH/ β -cyclodextrin (HA-BCD) in orofacial pain model in rodents. **Methods:** Swiss male mice (25-30 g) (CEPA/UFS # 04/12) subjected to orofacial pain models induced by formalin, capsaicin and glutamate. The animals (n = 6) were treated with the HA or HA-BCD (20 mg/kg), or vehicle, orally. The results were considered significant when $p < 0.05$. **Results:** It was observed that the HA-BCD complex presented an improvement in the anti-nociceptive effect in the formalin-induced and glutamate pain model compared to the control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). **Conclusion:** With the obtained results, therefore, we observed that the HA when complexed with a β -CD showed anti-nociceptive effect in animal models of orofacial use.

Key words: orofacial pain, cyclodextrin, hecogenin acetate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da hecogenina (A) e do acetato de hecogenina (B)	10
Figura 2: Esquema representativo das moléculas de ciclodextrina, formas α , β e γ respectivamente	11
Figura 3: Esquema representativo da indução de formalina e do tempo de avaliação comportamental	17
Figura 4: Esquema representativo da indução de capsaicina e do tempo de avaliação comportamental	18
Figura 5: Esquema representativo da indução de glutamato e do tempo de avaliação comportamental	18
Figura 6: Efeito do AH ou AH/ β CD no teste de formalina induzindo dor orofacial em camundongos. (A) primeira fase (0-5 min) e (B) segunda fase do teste de formalina (15-40 min)	21
Figura 7: Efeito do AH ou AH/ β CD no teste de capsaicina induzindo dor orofacial em camundongos	22
Figura 8: Efeito do AH ou AH/ β CD no teste de glutamato induzindo dor orofacial em camundongos	23

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Acetato de hecogenina

AH/ β CD ou HA/ β -CD – Complexo formado entre acetato de hecogenina e β -ciclodextrina.

CD – Ciclodextrina

EC – Eficiência de complexação

β CD ou β -CD – β -ciclodextrina.

FI – Filtração

LI – Liofilizado

MF – Mistura física

PC – Pasta de complexo

V.O. – Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. METODOLOGIA.....	14
4.1 Preparação do complexo.....	14
4.1.1 Material.....	14
4.1.2 Preparação de amostras.....	14
4.1.2.1 Mistura Física.....	14
4.1.2.2 Pasta de complexo.....	14
4.1.2.3 Liofilizado.....	15
4.1.2.4 Filtrado.....	15
4.2 Animais.....	15
4.3 Delineamento experimental.....	16
4.4 Protocolos experimentais.....	16
4.4.1 Nocicepção orofacial induzida por Formalina.....	16
4.4.2 Teste de nocicepção orofacial induzida por Capsaicina.....	17
4.4.3. Teste de nocicepção orofacial induzida por Glutamato.....	18
4.5 Descarte de animais.....	19
4.6 Análises estatísticas.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	24
7. REFERÊNCIAS.....	25

Inclusion complex between β -cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain.

Yasmim M.B.G. Carvalho^a, Paula P. Menezes^a, Bruna M.H. Sousa^a, Bruno S. Lima^a, Igor A.S. Trindade^a, Mairim R. Serafini^a, Erik W.M. Pereira^b, Marília M. Rezende^b, Jullyana S.S. Quintans^b, Lucindo J. Quintans-Júnior^b, Celso V. Nakamura^c, Edeildo F. Silva-Júnior^d, Alexandre C. Crispim^d, Thiago M. Aquino^d, Adriano A.S. Araújo^a. *

^a Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

^b Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil,

^c Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil,

^d Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil.

* Correspondência do autor em: Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, Av. Prof. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

Endereço de e-mail: yasmimgomess@gmail.com (Y.M.B.G. Carvalho), paulamenezes_16@yahoo.com.br (P.P. Menezes), nasabruna@hotmail.com (B.M.H. Sousa), bruunoo_ita@hotmail.com (B.S. Lima), igor_11n@hotmail.com (I.A.S. Trindade), maiserafini@hotmail.com (M.R. Serafini), erikpereira11@gmail.com (E.W.M. Pereira), mariliam.rezende@hotmail.com (M.M. Rezende), jullyanaquintans@gmail.com (J.S.S. Quintans), lucindojr@gmail.com (L.J. Quintans-Júnior), cvnakamura@gmail.com (C.V. Nakamura), edeildojr@hotmail.com (E.F. Silva-Júnior), sansandro_@hotmail.com (A.C. Crispim), thiago.aquino@iqb.ufal.br (T.M. Aquino), adriasa2001@yahoo.com.br (A.A.S. Araújo).

Informações do artigo:

História do artigo:

Recebido 6 de abril de 2017

Recebido em forma revisada 14 de junho de 2017

Aceito em 23 de junho de 2017

1. INTRODUÇÃO

A dor pode ser definida como uma sensação complexa, subjetiva e multidimensional que engloba tanto componentes afetivos e sensitivos quanto cognitivos e motivacionais [1]. Além desta complexidade, há desafios no cuidado e manejo da dor no sentido de existirem limitadas opções à mão para o tratamento dos diversos tipos de algesia e seus mecanismos específicos de condução dolorosa, e ainda, as reações não-desejáveis que acompanham estes medicamentos [2,3]

Mais especificamente a dor orofacial está relacionada a dor nas estruturas da cabeça, pescoço e rosto. A sua origem pode ser muscular, óssea, seios, estruturas articulares, pulpar e periodontal, glandular ou vascular [4]. Por ser uma das regiões do corpo que recebe mais vascularização e inervação, é na região orofacial que algumas das dores agudas mais comuns ocorrem [5]. É por estes e outros motivos que atualmente não se conhece com precisão a via de transmissão desse tipo de dor e, conseqüentemente, a dor orofacial é um dos maiores interesses na área da farmacologia pelo fato do arsenal terapêutico disponível não ser o mais eficaz e ainda trazerem alguns efeitos indesejáveis, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) [6].

Nessa perspectiva, Barreiro e Bolzani (2009) e Calixto e colaboradores (2000) enfatizaram como os produtos naturais entram como alternativa por se tratarem de uma fonte de propriedades farmacológicas bastante promissoras por conta de suas estruturas moleculares favoráveis, principalmente os óleos essenciais extraídos das plantas medicinais ricos em metabólitos secundários, e ainda baixa toxicidade [7,8].

As saponinas esteroidais, dentre elas a hecogenina e a diosgenina, presentes em espécies do gênero *Agave* ou “sisal”, são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica como base para síntese de hormônios esteroidais como os adrenocorticóides, anabolizantes e hormônios sexuais [9, 10]. Além disso, essa espécie é usada na medicina tradicional do nordeste brasileiro por suas propriedades analgésica e anti-inflamatória conhecidas [11,12].

Estudos recentes têm demonstrado que o acetato de hecogenina (AH) (Figura 1B), a hecogenina na forma acetilada, apresenta efeitos biológicos nas condições dolorosas e inflamatórias [13], incluindo efeito antimicrobiano [14] e anti-helmíntico [15]. Gama e colaboradores (2013) e Quintans e colaboradores (2014) por conta do perfil analgésico demonstrado, sugeriram que este efeito poderia estar relacionado com mecanismos de inibição da dor pelo sistema opioides [16, 17]. Mais evidências foram encontradas por

Quintans e colaboradores (2016), em que o AH mostrou efeito anti-hiperalgésico em modelo animal de dor musculoesquelética não-inflamatória [18].

A reação de acetólise na molécula de hecogenina faz-se necessária para manter a hidroxila no carbono 3 da molécula do esteroide, onde o grupo acetil atua como “grupo protetor” deste oxigênio da hidroxila, impedindo que reações químicas não-desejáveis ocorram, mantendo a estabilidade da molécula.

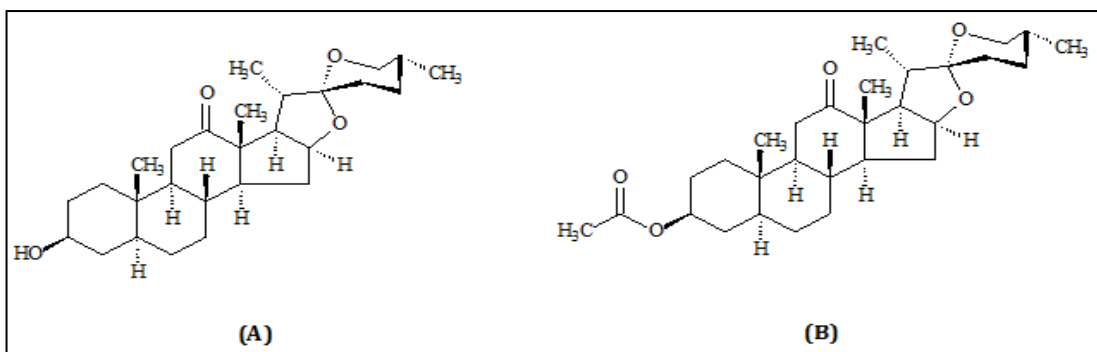


Figura 1: Estrutura molecular da hecogenina (A) e do acetato de hecogenina (B).

Devido à baixa hidrossolubilidade desta saponina, torna-se necessário soluções viáveis para contornar os problemas de solubilidade e estabilidade dessa molécula. As ciclodextrinas (CDs) são carboidratos compostos por unidades de D-glicopirranose (6 unidades é chamada de α -CD, 7 unidades de β -CD e 8 unidades de γ -CD), obtidas a partir da degradação do amido realizada pela enzima glicosil-transferase (Figura 2) [19, 20]. As hidroxilas que se orientam para o exterior da molécula de CD é o que confere a sua alta hidrossolubilidade, e as moléculas apolares e hidrofóbicas na cavidade interna facilitam a incorporação de substâncias químicas também apolares presentes nos óleos essenciais por exemplo [21].

A capacidade de formar complexos de inclusão através das CDs tem sido usada para melhorar a resposta terapêutica de fármacos, promovendo melhorias na solubilidade, estabilidade e permitindo uma redução nas doses e efeitos colaterais [22, 23]. Alguns estudos recentes comprovaram a eficácia de complexos formados por produtos naturais apolares e moléculas de CD em modelos experimentais de dor inflamatória como a fibromialgia [24] e também de dor oncológica [25].

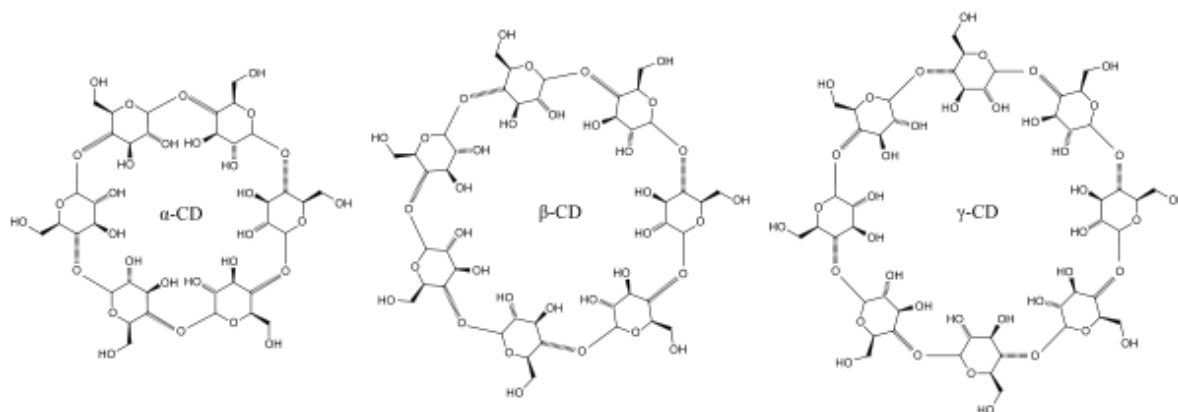


Figura 2: Esquema representativo das moléculas de ciclodextrina, formas α , β e γ respectivamente.

Para efetivar a formação do complexo de inclusão entre o acetato de hecogenina e a ciclodextrina, foi utilizado a forma β , já que é a mais usada para encapsulamento de substâncias não só pelo seu baixo custo (cerca de 10000 toneladas são produzidas por ano com valor aproximado de R\$ 16,65/kg) como também pelo diâmetro da cavidade desta forma, considerada ideal para incorporar drogas com peso molecular de 200 a 800 g/mol [26, 27, 28, 29].

Portanto, diante do exposto visamos estudar o efeito anti-nociceptivo do acetato de hecogenina formando complexos de inclusão com moléculas de ciclodextrina, em modelos animais de nocicepção orofacial.

2. JUSTIFICATIVA

A busca por alternativas terapêuticas que possam trazer menos efeitos indesejáveis faz-se cada vez mais necessária, no sentido da dificuldade que existe no tratamento para os diferentes tipos de dor e dos incontáveis efeitos colaterais que estes medicamentos trazem. Como já descrito em estudos anteriores, o acetato de hecogenina vem sendo classificado como uma substância química promissora pelas suas características antinociceptiva e anti-inflamatória [13,16, 17, 18].

Em face da baixa solubilidade em água desta saponina acetilada, há uma busca por um meio de melhorar sua hidrossolubilidade e consequentemente suas propriedades químicas e farmacológicas. Dentre as substâncias utilizadas no encapsulamento de fármacos e com aplicabilidade na indústria de alimentos devido sua segurança, preço e abrangência de uso, destaca-se as ciclodextrina (CDs) [17,30]. As CDs são produtos de degradação do amido, constituídas de unidades de α (1,4) D-glucopirranose, ligadas numa formação em anel [31] podem ser consideradas agentes nano-encapsuladores, oferecendo vantagens como aumento da solubilidade e estabilidade, e podem aumentar a biodisponibilidade de compostos lipofílicos [30]. Ainda assim, as moléculas de ciclodextrina são uma solução para o problema da solubilidade e biodisponibilidade dos óleos essenciais [32, 33].

Diante da necessidade de investigação de recursos terapêuticos para a melhoria no manejo ou tratamento das condições álgicas e/ou inflamatórias, o presente trabalho visa avaliar o efeito do acetato de hecogenina (AH) e do complexo de inclusão AH/ β CD, já que possui propriedades anti-inflamatórias e analgésica, sobre testes de dor orofacial em roedores, buscando encontrar os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos [11, 12, 13, 34, 35].

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade analgésica do Acetato de Hecogenina (AH) e Acetato de Hecogenina complexado com β -ciclodextrina (AH- β CD) em modelos de nocicepção orofacial em roedores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade do AH e AH- β CD em modelos de nocicepção orofacial.

4. MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO

4.1.1 Material

AH (pureza $\geq 90\%$), β -CD (pureza $\geq 97\%$), glutamato monossódico (Padrão de Referência da USP) e capsaicina ($\geq 95\%$, de *Capsicum* sp), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Acético ácido foi comprado da Vetec (Brasil).

4.1.2 Preparação de amostras

As amostras foram preparadas com base no peso molecular de AH ($472,66 \text{ g mol}^{-1}$) e peso molecular de β -CD ($1134,98 \text{ g mol}^{-1}$), com razões molares de 1: 1 e 1: 2 (AH: β -CD) por métodos de mistura física (MF), pasta de complexação (PC), liofilização (LI) e filtração (FI).

4.1.2.1 Mistura Física

A amostra de PM foi preparada por adição de AH a uma argamassa de ágata contendo β -CD em pó sob agitação manual, que foram então armazenados em recipientes de vidro selados. Este método de preparação foi utilizado por Menezes e colaboradores, 2012 [36].

4.1.2.2 Pasta de Complexo

A amostra de PC foi preparada pela adição de 2 ml de água a uma mistura de AH e β -CD, diretamente em um almofariz de ágata e depois mantido sob constante agitação manual. O material foi então seco à temperatura ambiente (num dessecador) até que um filme foi formado, que foi removido por trituração manual e então armazenados em recipientes de vidro herméticos.

4.1.2.3 Liofilizado

A amostra de LI foi preparada por adição de HA e β -CD a 20 ml de água destilada, esta solução foi submetida a agitação por um dispositivo de agitação magnética operando a 400 rpm (Quimis Q 261A21, Brasil) à temperatura ambiente por 36 horas, em seguida foi congelado – 72 °C por 4 horas e liofilizado. Depois, foi armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechados. Este método de preparação foi adaptado de Menezes e colaboradores (2012) [36].

4.1.2.4 Filtrado

A amostra FI foi preparada por adição de AH e β -CD a 20 ml de água destilada, esta solução foi submetida a agitação por um dispositivo de agitação magnética operando a 400 rpm (Quimis Q 261A21, Brasil) em temperatura ambiente por 36 horas, foi filtrado (filtro papel 150 mm) e armazenado em dessecador à temperatura ambiente até que toda a umidade foi removida. Depois, foi armazenado em recipientes de vidro hermético. Este método de preparação foi adaptado de Menezes e colaboradores (2012) [36].

Com base nos testes de caracterização e de eficiência de complexação (EC) realizados com os complexos produzidos, foi constatado que o melhor método de formação de complexo nesse caso foi o liofilizado na proporção de 1:2 (EC=92,0%), provando assim que o AH foi complexado com eficiência na cavidade da β -CD.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando 25-35g, com 2 a 3 meses de idade, oriundos do Biotério Setorial da Universidade Federal de Sergipe.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, sob as mesmas condições de temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e ruído. Com ciclo claro-escuro de 12:00 horas, com a fase clara iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, recebendo ração comercial (Purina; Labina) e água *ad libitum*, durante todo o período de experimentação científica.

Todos os protocolos experimentais propostos respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais

de Laboratório (SBCAL) e *Internacional Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS) e o Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), CEPA/UFS # 04/12.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais serão aleatoriamente divididos em 3 grupos (n=6):

1. Grupo controle negativo (veículo): água destilada, v.o.
2. Grupo experimental tratado com AH 20 mg/kg, v.o.
3. Grupo experimental tratado com AH- β CD 20 mg/kg, v.o.

4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Nocicepção orofacial induzida por Formalina

Foi realizada a administração de formalina (20 μ L- 2%) na região do lábio superior dos animais, conforme descrito por Clavelou et al. (1989) [37]. Inicialmente, cada animal foi colocado em uma caixa de madeira (30x30x30) com bases e laterais espelhadas e frente de vidro, por um período de 15 minutos para aclimação e minimizar o estresse ao novo ambiente. Após a injeção de formalina os animais foram colocados nas caixas e quantificamos o tempo de fricção espontânea na região orofacial animal. Observamos o animal em dois blocos, de 0-5 minutos (primeira fase) e de 15-40 minutos (segunda fase). Foi considerado como indicativo de nocicepção o quanto o animal potencializou o comportamento nociceptivo (“*rubbing*” facial) em relação ao período de ambientação. Para avaliar o efeito da substância-teste 60 minutos antes da injeção de formalina, grupos diferentes de camundongos foram pré-tratados por via oral com o veículo (água destilada), AH (20 mg/kg) ou AH- β CD (20 mg/kg).

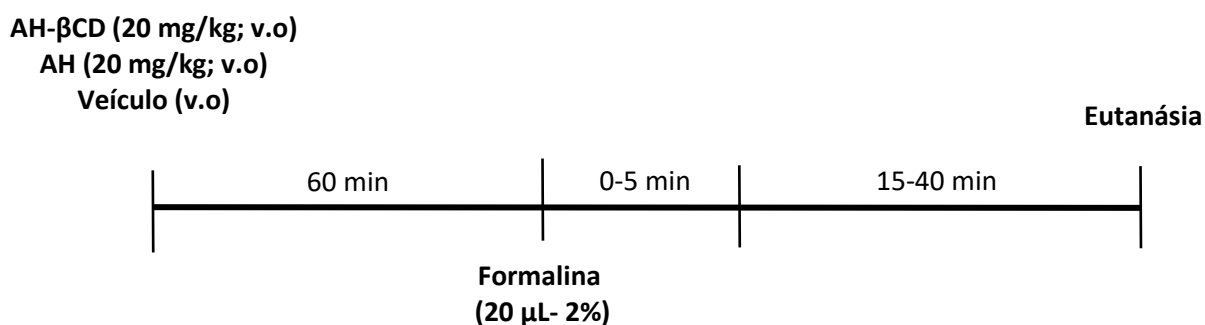


Figura 3: Esquema representativo da indução de formalina e do tempo de avaliação comportamental.

4.4.2 Teste de nocicepção orofacial induzida por Capsaicina

Para este teste foi utilizada a metodologia descrita por Pelissier et al. (2002), com modificações [38]. Inicialmente, os animais foram tratados com veículo (água destilada), AH (20 mg/kg) ou AH-βCD (20 mg/kg), v.o. Os animais foram colocados em caixas de madeira (30x30x30) com bases e laterais espelhadas e frente de vidro, por um período de 15 minutos para ambientação antes de receber o estímulo álgico. Decorrido o tempo de 60 minutos após o tratamento com a substância teste, foi feita uma injeção subcutânea de capsaicina 2,5 μg (20 μL) na região orofacial (lábio superior) dos animais. Imediatamente após a injeção, os animais foram recolocados na caixa de observação e foi registrado o tempo de fricção (“*rubbing*”) facial efetuado pelos mesmos durante 10-20 min, com base em estudos pilotos realizados onde foi constatado uma intensidade maior do comportamento de coçar a face durante esse período de tempo.

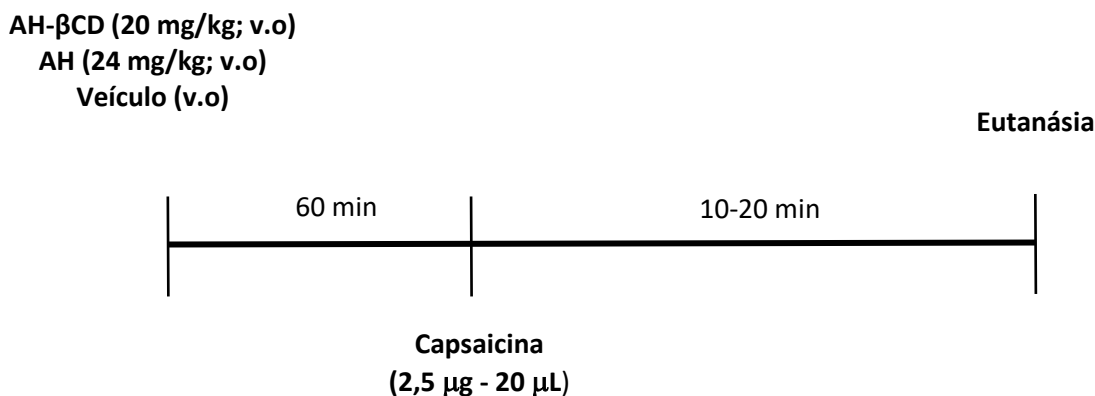


Figura 4: Esquema representativo da indução de capsaicina e do tempo de avaliação comportamental.

4.4.3. Teste de nocicepção orofacial induzida por Glutamato

Para este teste foi utilizada a metodologia descrita por Quintans-Júnior e colaboradores (2010) [39]. Inicialmente, os animais (n=6) foram tratados com veículo (água destilada), AH (20 mg/kg) ou AH- β CD (20 mg/kg), v.o. Posteriormente, colocamos os animais em uma caixa de madeira (30x30x30) com bases e laterais espelhadas e frente de vidro, por um período de quinze minutos para ambientação antes de receber o estímulo álgico. Decorrido o tempo de 60 minutos após o tratamento, foi feita uma injeção subcutânea de glutamato 25 mM (40 μ L) na região perinasal (lábio superior) dos animais. Imediatamente após a injeção, os animais foram novamente colocados na caixa de observação e foi registrado o tempo de “*rubbing*” facial regional efetuado durante 20 minutos. Foi considerado como indicativo de nocicepção o quanto o animal potencializou o comportamento nociceptivo.

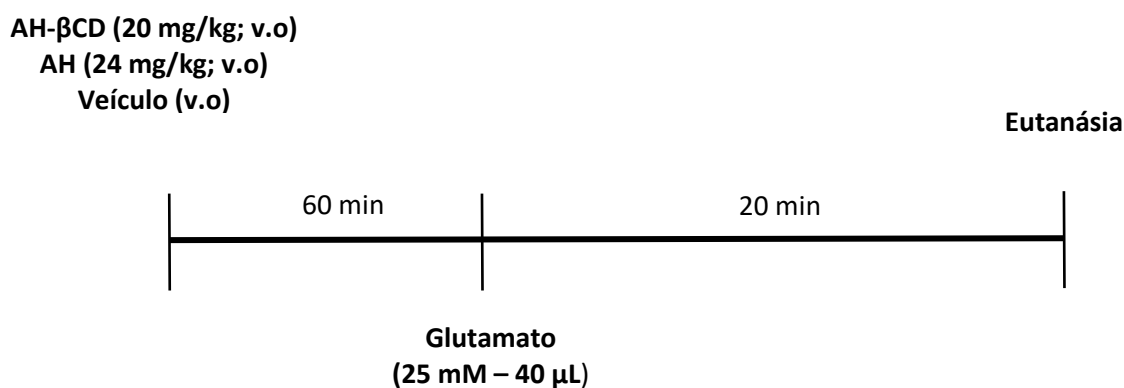


Figura 5: Esquema representativo da indução de glutamato e do tempo de avaliação comportamental.

4.5 DESCARTE DE ANIMAIS

Após o termino dos experimentos os animais foram eutanasiados, alocados em sacos plásticos identificados como material infectante juntamente com o CEPA e por fim entregues no biotério setorial para o descarte adequado, seguindo os protocolos da vigilância sanitária.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram tratados estatisticamente usando o Programa GraphPad Prism[®] 5.0 através de Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste Tukey ou Dunnet, conforme o caso. Sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que a administração do AH e do complexo AH/ β CD (20 mg/kg, v.o.) reduziram a nocicepção causada pela formalina, evidenciada pela redução do comportamento de coçar (“*rubbing*” facial), em ambas as fases do teste em comparação com o veículo (controle) com $p < 0.01$ e $p < 0.001$ respectivamente. Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 6A, B).

A sensibilidade dolorosa causada pela injeção perinasal de formalina (2%) compreende duas fases distintas com mecanismos diferentes, sendo a primeira caracterizada como dor neurogênica e a segunda como dor inflamatória [40, 41]. Quando a formalina é injetada na região orofacial, ela excita os neurônios nociceptivos do núcleo trigeminal espinal, por isso esse teste de nocicepção orofacial induzida por formalina se torna mais específico na avaliação central da nocicepção. Na primeira ocorre ativação direta dos nociceptores de fibras aferentes do tipo C, ou seja, uma sensação dolorosa mediada pelo SNC com liberação de substância P e outros neuropeptídeos [5, 42]. Já a segunda fase é causada pela liberação de mediadores inflamatórios como aminoácidos excitatórios, PGE2, óxido nítrico, cininas, dentre outros peptídeos em combinação com ativação de fibras aferentes nociceptivas [43]. Sabe-se ainda que a hiperalgesia desenvolvida pela injeção de formalina tem relação com os receptores glutamatérgicos, os NMDA [44].

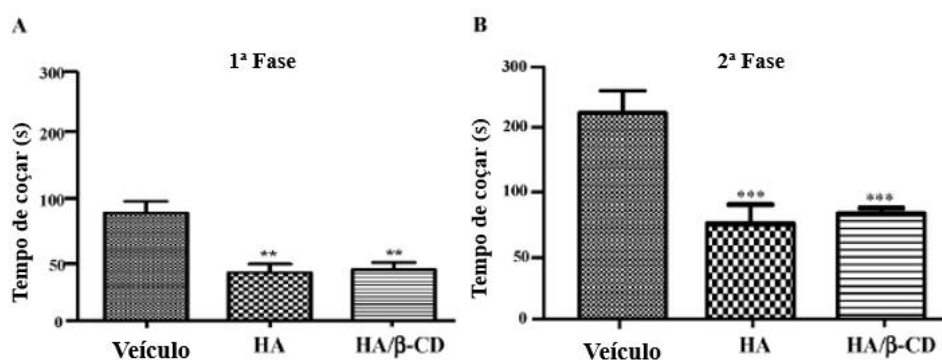


Figura 6: Efeito do AH ou AH/βCD no teste de formalina induzindo dor orofacial em camundongos. (A) primeira fase (0-5 min) e (B) segunda fase do teste de formalina (15-40 min). Veículo (controle) e AH ou AH/βCD (20 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 hora antes da indução com a formalina. Cada coluna representa média ± E.P.M (n=6, por grupo). **p < 0.01 ou ***p < 0.001 vs. Controle (ANOVA seguido por teste de Tukey).

Desse modo, podemos observar que tanto o AH quanto o AH/βCD reduziram a nocicepção evidenciada pelo tempo de coçar, em segundos, em ambas as fases frente a administração de formalina. Quando isso ocorre, pode-se sugerir uma possível ação da substância analgésica no SNC.

Em contrapartida, os resultados obtidos da nocicepção orofacial induzida por capsaicina mostraram que apenas o grupo tratado com o AH reduziu de modo significativo (p < 0.001) o comportamento de “*rubbing*” facial em comparação com o grupo controle (Figura 7). A capsaicina é o componente majoritário da pimenta vermelha. Atua na ativação dos receptores transitórios da família vanilóide (TRPVs), especialmente os TRPV1, que é um dos canais de influxo de Ca^{+2} envolvidos na migração celular que é importante no papel da transdução dolorosa [45, 46], principalmente na via trigeminal. A capsaicina é bastante utilizada nos estudos pré-clínicos de mecanismos centrais da dor [47, 49].

Esses resultados podem ter ocorrido pelo fato de que apenas 4 mg/kg do acetato de hecogenina estão formando complexo com a βCD, e essa quantidade não foi suficiente para produzir o efeito de reduzir a nocicepção observada pelo tempo de coçar (s) dos camundongos.

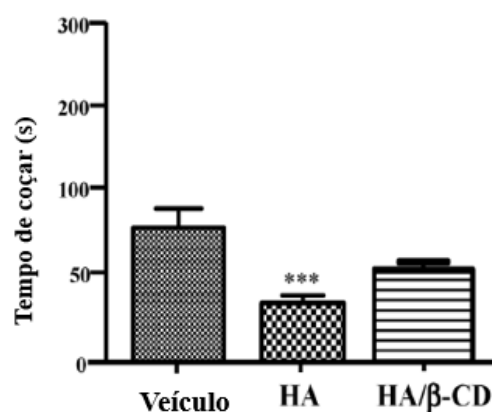


Figura 7: Efeito do AH ou AH/βCD no teste de capsaicina induzindo dor orofacial em camundongos. Veículo (controle) e AH ou AH/βCD (20 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 hora antes da indução com a capsaicina. Cada coluna representa média ± E.P.M (n=6, por grupo). ***p < 0.001 vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A fim de avaliar o comportamento do AH e AH/βCD com os neurotransmissores da dor, foi feito também o teste de glutamato, já que é um dos principais neurotransmissores endógenos da dor orofacial [48]. A administração oral (AH ou AH/βCD 20 mg/kg, v.o.) produziu uma inibição significativa ($p < 0.001$) da resposta nociceptiva causada pela injeção de glutamato (Figura 8). O glutamato está presente tanto nos terminais periféricos quanto nos neurônios da raiz do gânglio dorsal e trigeminal, e quando drogas tem a habilidade de reduzir o componente da dor neste modelo, significa um provável efeito regulatório na liberação do neurotransmissor deste sistema [39, 49, 50].

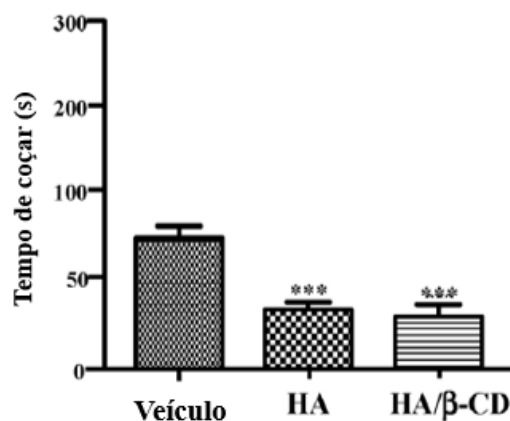


Figura 8: Efeito do AH ou AH/βCD no teste de glutamato induzindo dor orofacial em camundongos. Veículo (controle) e AH ou AH/βCD (20 mg/kg, v.o.) foram administrados 1 hora antes da indução com o glutamato. Cada coluna representa média ± E.P.M (n=6, por grupo). **p < 0.01 ou ***p < 0.001 vs. Controle (ANOVA seguido por teste de Tukey).

Assim sendo, foi observado que tanto o AH quanto o AH/βCD reduziram a nocicepção evidenciada pelo tempo de coçar, em segundos, no teste realizado com a administração de glutamato. Esses achados sugerem que as substâncias possuem efeito no sistema glutamatérgico, ou nos receptores NMDA, de reduzir a liberação desse neurotransmissor e, em consequência, reduzir a nocicepção.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo em questão evidenciaram que o acetato de hecogenina quando complexado com a β -CD produziu efeito analgésico em modelos de dor orofacial em roedores, melhor do que o AH puro, sugerindo que a β -CD aumentou a solubilidade em água e contribuiu para melhora nesse sentido. Portanto, podemos ver o complexo de inclusão formado entre o AH e a β -CD como uma promissora ferramenta para o tratamento da dor com benefícios terapêuticos, e o aprimoramento dessa formulação como uma perspectiva para avançar nos estudos pré-clínicos e clínicos.

REFERÊNCIAS

1. B. Calvino, R.M. Grilo. Central pain control. *Joint Bone Spine*. 73(1) (2006) 10–16.
2. K.M. Hargreaves. Orofacial pain. *Pain*. 152 (3 Suppl) (2011) S25-32.
3. M.M. De Sousa, M.A. Pereira, J.V. Ardenghi et al. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 93 (2009) 40–46.
4. S.S. De Rossi. Orofacial pain: A primer. *Dent Clin N Am*. 57 (2013) 383–392, 2013.
5. P. Raboisson, R. Dallel. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 28 (2004) 219–26.
6. I. Kissin. The development of new analgesics over the past 50 years: A lack of real breakthrough drugs. *Anesth. Analg*. 110 (2010) 780–789.
7. E.J. Barreiro, E.V. Bolzani. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*. 32(3) (2009) 679-688.
8. J.B. Calixto, A. Beirith, J. Ferreira, A.R. Santos, V.C. Filho, R.A. Yunes. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res*. 14 (2000) 401–18.
9. K. Hostettmann, A. Marston. Saponins: Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: Cambridge University Press (1995).
10. A.M. Ghoghari, M. Rajani. Densitometric determination of hecogenin from *Agave americana* Leaf using HPTLC. *Chromatographia*. 64(1-2) (2006) 113-116.
11. V.E. Tyler, L.R. Brady, J.E. Robbers. *Pharmacognosy*. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, 1988.
12. A.T. Peana, M.D. Moretti, V. Manconi, G. Desole, P. Pippia. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Med*. 63(3) (1997) 199-202.
13. Dunder et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, Asparagaceae. *Rev. Bras. Farmacogn*. 20(3) (2010) 376-381.

14. J.D.G. Santos, A. Branco, A.F. Silva, C.S.R. Pinheiro, A.G. Neto, A.P.T. Uetanabaro, S.R.O.D. Queiroz, J.T.A. Osuna. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2009) 6181–6184.
15. L.F. Domingues, M.B. Botura, A.C.F.G. Cruz, C. Yuki, G.D. Silva, M.S. Costa, G. Murphy, E.L.T. Moreira, I.D.S. Meneses, M.G.A.R. Almeida, A. Branco, M.A.O. Almeida, M.J.M. Batatinha. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19 (2010) 270–272.
16. K.B. Gama, J.S.S. Quintans, A.R. Antonioli, L.J. Quintans-Junior, W.A. Santana, A. Branco, M.B.P. Soares, C.F. Villarreal. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. *J. Nat. Prod.* 76 (2013) 559–563.
17. J.S.S. Quintans et al. Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models - A Systematic Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 114 (2014) 442-450.
18. J.S.S. Quintans, E.W.M. Pereira, Y.M.B.G. Carvalho, P.P. Menezes, M.R. Serafini, M.V.A. Batista, C.D.L.F.A. Moreira, A.N.Á. Lima, A. Branco, J.R.G.S. Alameida, D.P. Gelain, G. Zengin, A.A.S. Araújo, L.J. Quintans Jr. Host-guest inclusion complexation of β -cyclodextrin and hecogenin acetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain, *Process Biochem.* 51 (2016) 1–9.
19. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. Khar. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech* 6(2) (2005) E329-357.
20. G. Crini. Review: a history of cyclodextrins. *Chemical Reviews* 114 (21) (2014) 10940-10975.
21. M.E. Davis, M.E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 3 (2005) 1023-1035.
22. R. G, Brito. et al. Enhanced analgesic activity by cyclodextrins - a systematic review and meta-analysis. *Expert opinion on drug delivery*, (2015) 1-12.
23. M. G. Oiveira et al. Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents.* 25 (2015) 897-907.
24. L.J. Quintans Jr, R.G. Araújo, A.A.S. Brito, P.P. Santos, J.S.S Quintans, G.F. Menezes, M.R. Serafini, V. Silva, F.M. Carvalho, N.K. Brogden, K.A. Sluka. β -

- caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn, *Life Sci.* 149 (2016) 34–41.
25. A.G. Guimarães, M.A. Oliveira, R.S. Alves, P.P. Menezes, M.R. Serafini, A.A. Araújo, D.P. Bezerra, L.J. Quintans-Júnior. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols, *Chem. Biol. Interact.* 227 (2015) 69–76.
 26. N.A. Khan, M. Durakshan. Cyclodextrin: an overview. *Int J Bioassays* 2 (2013) 858-65.
 27. E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares, M. Henriques. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym* 101 (2014) 121-35.
 28. H. Arima, K. Motoyama, T. Irie. Recent findings on safety profiles of cyclodextrins, cyclodextrin conjugates, and olypseudorotaxanes. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine* (2011).
 29. T. Loftsson, D. Duchêne. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329 (2007) 1-11
 30. H. M. C. Marques. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal.* 25 (2010) 313-326.
 31. J. Szejtli. Cyclodextrins. In: K. Fromming, J. Szejtli. *Cyclodextrins in Pharmacy*. London: Kluwer Academic Publishers. 5 (1994) 1-18.
 32. J. S. S. Quintans et al. Improvement of p-cymene antinociceptive and antiinflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*, 20 (5) (2013) 43640
 33. L.J. Quintans Jr et al. β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 113 (3) (2013) 16772.
 34. C. Corbierre, B. Liagre, A. Bianchi, K. Bordji, M. Dauça, P. Netter, J.L. Beneytot. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 22(4) (2003) 899-905..
 35. G.S. Cerqueira, G.S. Silva, E.R. Vasconcelos, A.P.F. Freitas, B.A. Moura, D.S. Macedo, A.L. Souto, J.M. Barbosa Filho, L.K.A. Leal, G.A.C. Brito, C. Souccar, G.S.B. Viana. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on

- experimental models of gastric ulcer in mice. *Eur J Pharmacol.* 15 (1-3) (2012) 260-9.
36. P.P. Menezes, M.R. Serafini, B.V. Santana, R.S. Nunes, L.J. Quintans Jr, G.F. Silva, I. A. Medeiros, M. Marchioro, B.P. Fraga, M.R.V. Santos, A.A.S. Araújo, Solid-state b-cyclodextrin complexes containing geraniol, *Thermochim. Acta* 548 (2012) 45–50.
 37. P. Clavelou et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neuroscience letters.* 103(3) (1989) 349–353.
 38. T. Pelissier, J. Pajot, R. Dallel. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain.* 96 (1-2) (2002) 81–87.
 39. L.J. Quintans Jr, M.S. Melo, D.P. De Sousa, A.A. Araújo, A.C. Onofre, D.P. Gelain, J.C. Gonçalves, D.A. Araujo, J.R. Almeida, L.R. Bonjardim. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability, *J. Orofac. Pain* 24 (3) (2010) 305–312.
 40. J.H. Roseland, A. Tjolsen, B. Moele, K. Hole. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain.* 42 (1990) 235-242.
 41. P. Luccarini, A. Childeric, A.M. Gaydier, D. Voisin, R. Dallel. The orofacial formalin test in mouse: A behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *Pain.* 7 (2006) 908-914.
 42. D. Le Bars, M. Gozariu, S.W. Cadden. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53 (2001) 597–652.
 43. A. Capuano, A. De Corato, M. Treglia, G. Tringali, C. Dello Russo, P. Navarra. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *Eur J Pharmacol.* 605 (2009) 57–62.
 44. A. Beirith, A.R.S. Santos, J.B. Calixto. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924 (2002) 219-228.
 45. A.S. Holanda Pinto, L.M.S. Pinto, M.A. Guedes, et al. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha, beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine.* 15 (2008) 630-634.
 46. J. Waning, J. Vriens, G. Owsianik. et al. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels. *Cell Calcium.* 42 (2007) 17-25.

47. P. Holzer. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, 43 (2) (1991) 143-201.
48. O. Gazerani, et al. Effects of subcutaneous administration of glutamate on pain, sensitization and vasomotor responses in healthy men and women. *Pain*. 124(3) (2006) 338-348.
49. D.K. Lam, B.J. Sessle, J.W. Hu. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents. *Brain Res* 1251 (2009) 130-139.
50. D.K. Lam, B.J. Sessle, J.W. Hu. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception II: Activation and central sensitization in brainstem neurons with deep craniofacial afferent input. *Brain Res*. 1253 (2009) 48-59.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE NANOESTRUTURAS CONTENDO HECOGENINA COMPLEXADA EM B- CICLODEXTRINA", sob coordenação do **Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (protocolo CEPA 04/2012)** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, "ad referendum".

São Cristóvão, 27 de abril de 2012.

Prof.^a Dr.^a Flávia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Inclusion complex between β -cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain



Yasmim M.B.G. Carvalho^a, Paula P. Menezes^a, Bruna M.H. Sousa^a, Bruno S. Lima^a,
 Igor A.S. Trindade^a, Mairim R. Serafini^a, Erik W.M. Pereira^b, Marília M. Rezende^b,
 Julliana S.S. Quintans^b, Lucindo J. Quintans-Júnior^b, Celso V. Nakamura^c,
 Edeildo F. Silva-Júnior^d, Alexandre C. Crispim^d, Thiago M. Aquino^d, Adriano A.S. Araújo^{a,*}

^a Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^b Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

^c Department of Basic Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

^d Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2017

Received in revised form 14 June 2017

Accepted 23 June 2017

Keywords:

Steroidal saponin

Cyclodextrin

Opioid

pain

Antinociception

ABSTRACT

Hecogenin acetate (HA) is a steroidal saponin acetylated with pharmacological properties which have already been described in the literature such as, anti-inflammatory, anti-hyperalgesic and antinociceptive, but it has low solubility in aqueous media. Therefore, in an attempt to overcome this, we set out to create inclusion complexes between HA and β -cyclodextrin (β -CD) and evaluate the antinociceptive effects in the orofacial nociception in mice. The complexes were prepared using different methods in the molar ratios 1:1 and 1:2 and characterized physicochemically. The results of the physicochemical characterization elucidated inclusion complexes formation between β -CD and HA by freeze drying method in the molar ratio 1:2, which obtained a complexation efficiency of 92% and produced superior analgesic effect in animal models for orofacial pain at a lower dose when compared to HA alone.

© 2017 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Orofacial pain represents a major medical and social problem in the United States and has been demonstrating a steady increase over the last several decades [1]. Its pathophysiology and cause is related to cranial neuralgia, headache, dental pain, temporomandibular disorders and persistent idiopathic facial pain; referring to pain associated with the soft and hard tissues of the head, face and neck [2]. Currently, the pharmacological treatments used such

as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), opioids, peripheral analgesic, antidepressant drugs and corticoids present few effectiveness due to non-specificity and pharmacoresistance [3].

In this sense, the natural products (NPs) has been a promising alternative for new chemical entities with possible applicability in orofacial pain, hoping to discover new biologically active substances that may offer new possibility of treatment, since there is no pharmacological treatments which may result in clinical improvement without significant side effects in these pathological conditions [4]. Hecogenin is steroidal saponin, found in the leaves of species from the *Agave* genus, used by pharmaceutical industry in the production of oral contraceptives [5,6].

Moreover, hecogenin acetate (HA) is a steroidal saponin acetylated with analgesic property, acting in descending pain-inhibitory mechanisms through its action on the opioid receptors (mainly in central nervous system) and reduction of pro-inflammatory cytokines, as IL-1 β [7,8]. Presents poor solubility in water and the use of β -cyclodextrin (β -CD) seems to be promising for produce improvements in solubility and bioavailability of compounds non-polar, because have suitable molecular

* Corresponding author at: Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon, Jardim Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

E-mail addresses: yasmimgomess@gmail.com (Y.M.B.G. Carvalho), paulamenezes_16@yahoo.com.br (P.P. Menezes), nasabruna@hotmail.com (B.M.H. Sousa), brunoo_jta@hotmail.com (B.S. Lima), igor_11n@hotmail.com (I.A.S. Trindade), mairimserafini@hotmail.com (M.R. Serafini), erikpereira11@gmail.com (E.W.M. Pereira), mariliam.rezende@hotmail.com (M.M. Rezende), jullianaquintans@gmail.com (J.S.S. Quintans), lucindojr@gmail.com (L.J. Quintans-Júnior), cynakamura@gmail.com (C.V. Nakamura), edeildojr@gmail.com (E.F. Silva-Júnior), saesandro_9@hotmail.com (A.C. Crispim), thiago.aquino@iqb.ufal.br (T.M. Aquino), adriano2001@yahoo.com.br (A.A.S. Araújo).